

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
4. Januar 2001 (04.01.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 01/00847 A1

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: C12N 15/53,
9/02, 1/21, C12P 17/12, 19/38

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP00/05850

(22) Internationales Anmeldedatum:
23. Juni 2000 (23.06.2000)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
199 29 364.3 25. Juni 1999 (25.06.1999) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von
US): BASF-LYNX BIOSCIENCE AG [DE/DE]; 69120
Heidelberg (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): MACK, Matthias
[DE/DE]; Mönchhofstrasse 3 C, 69120 Heidelberg (DE).
HERBSTER, Karin [DE/DE]; Kolpingstrasse 23a, 76694
Forst (DE).

(74) Anwalt: GOLDSCHIED, Bettina; BASF Aktiengesellschaft, 67056 Ludwigshafen (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

- Mit internationalem Recherchenbericht.
- Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist: Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen.

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

WO 01/00847 A1

(54) Title: DIHYDROOROTATE DEHYDROGENASE SEQUENCE OF *CORYNEBACTERIUM GLUTAMICUM* AND THE USE THEREOF IN MICROBIAL PRODUCTION OF PYRIMIDINE AND/OR COMPOUNDS USED WITH PYRIMIDINE

(54) Bezeichnung: DIE SEQUENZ DER DIHYDROOROTAT-DEHYDROGENASE AUS *CORYNEBACTERIUM GLUTAMICUM* UND DEREN EINSATZ BEI DER MIKROBIELLEN PRODUKTION VON PYRIMIDINEN UND/ODER MIT PYRIMIDIN VERWANDTEN VERBINDUNGEN

(57) Abstract: The invention relates to nucleotide sequences of a gene (pyrD) for biosynthesis of pyrimidine from *Corynebacterium glutamicum* and to the use thereof in microbial production of pyrimidine.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung besteht aus Nucleotidsequenzen eines Gens (pyrD) für die Pyrimidinbiosynthese aus *Corynebacterium glutamicum* und ihrem Einsatz zur mikrobiellen Produktion von Pyrimidinen.

Die Sequenz der Dihydroorotat-Dehydrogenase aus *Corynebacterium glutamicum* und deren Einsatz bei der mikrobiellen Produktion von Pyrimidinen und/oder mit Pyrimidin verwandten Verbindungen

5

Beschreibung

Die vorliegende Erfindung befaßt sich mit dem Produktionsprozeß von Pyrimidinen durch Fermentation mit Hilfe eines gentechnisch
10 veränderten Organismus. Diese Erfindung besteht in der Sequenz der Dihydroorotat-Dehydrogenase aus *Corynebacterium glutamicum* und deren Einsatz zur mikrobiellen Produktion von Pyrimidinen und/oder von mit Pyrimidin verwandten Verbindungen.

- 15 Der Biosyntheseweg für Pyrimidine ist für alle lebenden Organismen essentiell (ein Übersichtsartikel hierzu findet sich von Switzer, R. L. und Quinn, C. L. in *Bacillus subtilis* (Hrsg.: Sonenshein, A. L., Hoch, J. A. und Losick, R., American Society for Microbiology, Washington, D.C.), 1993, S. 343-358. Die Pyri-
20 midinnucleotide sind Pyrimidinderivate und als solche aktivierte Vorstufen der DNA und RNA und für viele Biosynthesewege. In den Pyrimidinnucleosiden Cytidin, Uridin, Deoxycytidin und Deoxythymidin ist eine Pyrimidinbase an eine Pentose gebunden, die Pyrimidinnucleotide sind die Phosphatester der Pyrimidinnucleoside.
25 Pyrimidinnucleoside und Pyrimidinnucleotide und deren Derivate sind auch wichtige Ausgangsverbindungen zur Synthese wertvoller Arzneimittel, wie z.B. CDP-Cholin, Orotsäure oder UMP (ein Übersichtsartikel hierzu gibt es von Kuninaka, A. in *Biotechnology*, Vol. 6 (Hrsg.: Rehm, H.-J. und Reed, G.), VCH, Weinheim, Deutsch-
30 land, 1996, S. 561-612)

Viele, aber nicht alle Mikroorganismen können ihre Pyrimidinnucleotide sowohl *de novo* als auch aus von außen angebotenen Pyrimidinbasen und Pyrimidinnucleosiden synthetisieren. Pyrimidin-
35 basen und/oder Pyrimidinnucleoside kommen normalerweise nicht intrazellulär vor. Sie können jedoch unter manchen Wachstumsbedingungen im Überschuß gebildet werden und werden dann in das Kulturmedium ausgeschieden. Darum lassen sich Mikroorganismen zur fermentativen Produktion von Pyrimidinnucleotiden und/oder ver-
40 wandten Verbindungen einsetzen.

Die Biosyntheseleistung der Mikroorganismen für Pyrimidinnucleotide läßt sich durch gentechnische Veränderung des Pyrimidinbiosynthesewegs optimieren. Gentechnische Veränderung bedeutet hier-
45 bei, daß die Anzahl der Genkopien und/oder die Geschwindigkeit der Transkription der Gene für den Pyrimidinsyntheseweg erhöht wird. Als Folge hiervon steigt der Anteil an Genprodukt und die

intrazelluläre enzymatische Aktivität. Eine erhöhte enzymatische Aktivität führt zu einer vermehrten Umwandlung von im Nährmedium angebotenen Verbindungen zu Pyrimidinnucleotiden und/oder verwandten Verbindungen und steigert so die Syntheseleistung. So konnte man zeigen, daß z.B. ein Anstieg der Aktivität der Dihydroorotat-Dehydrogenase, die die Oxidation von (S)-Dihydroorotat zu Orotat katalysiert - dies ist die vierte Stufe bei der *de novo* Pyrimidinbiosynthese für Pyrimidinnucleotide - die UMP-Syntheseleistung in *Corynebacterium ammoniagenes* erhöht (Nudler, A. A., Garibyan, A. G. und Bourd, G. I. (1991) FEMS Microbiol. Lett. 82:263-266).

Die Erfindung befaßt sich mit dem neuen *pyrD*-Gen für die Dihydroorotat-Dehydrogenase des Pyrimidinbiosynthesewegs aus *Corynebacterium glutamicum* und seinem Einsatz zur Herstellung von Pyrimidinnucleotiden und/oder mit Pyrimidin verwandten Verbindungen.

Ein Teil der Erfindung besteht in dem *pyrD*-Genprodukt. Die SEQ ID NR. 2 beschreibt eine Polypeptidsequenz. Das *pyrD*-Gen kodiert ein Polypeptid aus 322 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 33953. Die vorliegende Erfindung befaßt sich aber auch mit funktionellen Derivaten dieses Polypeptids, die man erhalten kann, wenn man in der SEQ ID NR. 2 durch Deletion, Insertion oder Substitution oder durch eine Kombination von Deletion, Insertion und Substitution eine oder mehrere Aminosäuren, vorzugsweise bis zu 25% der Aminosäuren ersetzt, am besten bis zu 15%. Der Ausdruck funktionelles Derivat bedeutet, daß die Enzymaktivität des Derivats noch in der gleichen Größenordnung liegt wie die des Polypeptids mit der Sequenz SEQ ID NR. 2.

Ein weiterer Teil der Erfindung besteht in den Polynucleotidsequenzen, die die oben beschriebenen Polypeptide kodieren. Die Polynucleotidsequenzen lassen sich ausgehend von Sequenzen, die man aus *Corynebacterium glutamicum* isoliert (d.h. SEQ ID NR. 1), erzeugen, in dem man diese Sequenzen durch ortsgerichtete Mutagenese modifiziert oder nach Rückübersetzung des entsprechenden Polypeptids mit dem genetischen Code eine chemische Totalsynthese ausführt.

Diese Polynucleotidsequenzen können am besten in Form von Genkonstrukten zur Transformation von Wirtsorganismen, vorzugsweise von Mikroorganismen, eingesetzt werden. Diese Genkonstrukte bestehen zumindest aus einer Kopie eines der Polynucleotide zusammen mit zumindest einer regulatorischen Sequenz. Regulatorische Sequenzen umfassen Promotoren, Terminatoren, Verstärker und ribosomale Bindungsstellen.

3

Bevorzugte Wirtsorganismen für die Transformation mit diesen Genkonstrukten sind *Corynebacterium*- und *Bacillus*-Arten, auch jeden eukaryontischen Mikroorganismus kann man dafür einsetzen, vorzugsweise Hefestämme der Gattung *Ashbya*, *Candida*, *Pichia*,
5 *Saccharomyces* und *Hansenula*.

Ein weiterer Teil der Erfindung besteht im Herstellungsprozeß für Pyrimidine und Pyrimidinderivate mit Hilfe der Kultivierung eines Wirtsorganismus, der in der oben beschriebenen Art transformiert
10 ist, und in der nachfolgenden Isolierung der Pyrimidine. Unter einem Pyrimidinderivat versteht man eine Verbindung mit einem Pyrimidinring, das sich dadurch herstellen läßt, daß man einen Wirtsorganismus mit einem der der hier vorliegenden Erfindung entsprechenden Polynucleotide transformiert.

15

Die Verfahren und Vorgehensweisen zur Kultivierung von Mikroorganismen und zur Isolierung von Pyrimidinen aus einer mikrobiellen Produktion sind dem geschulten Personal geläufig.

20 Die folgenden Beispiele beschreiben, wie die Erfindung entstand und ihre Anwendung bei der gentechnischen Veränderung von Mikroorganismen zur erhöhten Produktionsleistung von Pyrimidinnucleotiden und/oder verwandten Verbindungen.

25 Beispiel 1

Darstellung einer Genombibliothek aus *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032

30 DNA aus dem Genom von *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 läßt sich nach Standardmethoden gewinnen, die bereits beschrieben sind, z. B. von J. Altenbuchner und J. Cullum (1984, Mol. Gen. Genet. 195:134-138). Die Genombibliothek läßt sich nach Standardvorschriften (z.B.: Sambrook, J. et al. (1989) Molecular cloning:
35 a laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press) mit einem beliebigen Klonierungsvektor herstellen, z.B. pBluescript II KS- (Stratagene) oder ZAP Express™ (Stratagene). Dabei kann man jede beliebige Fragmentgröße benutzen, vorzugsweise Sau3AI-Fragmente mit einer Länge von 2-9 kb, die sich in Klonierungsvek-
40 toren mit verdautem BamHI einbinden lassen.

Beispiel 2

Analyse der Nucleinsäuresequenz der Genombibliothek

- 5 Einzelne *E. coli*-Klone kann man aus der im Beispiel 1 dargestellten Genombibliothek auswählen. *E. coli*-Zellen werden nach Standardverfahren in geeigneten Medien kultiviert (z.B. LB ergänzt mit 100 mg/l Ampicillin), und danach läßt sich die Plasmid-DNA isolieren. Klont man Genomfragmente aus der DNA von *Corynebacte-*
10 *rium glutamicum* in pBluescript II KS- (siehe Beispiel 1), läßt sich die DNA mit Hilfe der Oligonucleotide 5'-AATTAACCTCAC-TAAAGGG-3' und 5'-GTAATACGACTCACTATAGGGC-3' sequenzieren.

Beispiel 3

- 15 Computeranalyse der Sequenzen der isolierten Nukleinsäuren

Die Nucleotidsequenzen lassen sich z.B. mit Hilfe des BLASTX-Algorithmus (Altschul et al. (1990) J. Mol. Biol. 215: 403-410)
20 aneinanderfügen. Auf diesem Weg kann man neuartige Sequenzen entdecken und die Funktion dieser neuartigen Gene aufklären.

Beispiel 4

- 25 Identifizierung eines *E. coli*-Klons, der das Gen für die Dihydroorotat-Dehydrogenase (EC 1.3.3.1) enthält

Bei der Analyse der *E. coli*-Klone, wie sie im Beispiel 2 beschrieben wurde, an die sich die im Beispiel 3 beschriebene
30 Analyse der dabei erhaltenen Sequenzen anschloß, ergab sich eine Sequenz, wie sie mit SEQ ID NR. 1 beschrieben ist. Bei der Anwendung des BLASTX-Algorithmus (siehe Beispiel 3) ergab diese Sequenz Ähnlichkeit mit der Dihydroorotat-Dehydrogenase (PyrD; EC 1.3.3.1) aus verschiedenen Organismen. Die größte Ähnlichkeit war
35 mit der Dihydroorotat-Dehydrogenase aus *Mycobacterium leprae* gegeben (SWISSPROT P46727; 67% Übereinstimmung auf der Stufe der Aminosäuren).

Beispiel 5

- 40 Der Einsatz des Gens für die Dihydroorotat-Dehydrogenase (*pyrD*) aus *Corynebacterium glutamicum* zur Produktion von Pyrimidin und/oder mit Pyrimidin verwandten Verbindungen

- 45 Das Gen für die Dihydroorotat-Dehydrogenase aus *Corynebacterium glutamicum* kann man mit Hilfe geeigneter Klonierungs- und/oder Expressionssysteme in das *Corynebacterium glutamicum* oder in

5

einen beliebigen anderen Mikroorganismus einführen. Es lassen sich gentechnisch veränderte Mikroorganismen herstellen, die sich vom Wildtyp in der Aktivität oder der Anzahl der Kopien der Gene unterscheiden. Diese neuartigen, gentechnisch veränderten Stämme kann man zur Produktion von Pyrimidin und/oder mit Pyrimidin verwandten Verbindungen einsetzen.

Sequenzliste

10 (I) Allgemeine Angaben

(1) Anmelder:

- (A) Name: BASF-LYNX Bioscience AG
15 (B) Straße: Im Neuenheimer Feld 515
(C) Stadt: Heidelberg
(D) Land: Deutschland
(E) Postleitzahl: 69120
(F) Telephon: 06221/4546
20 (G) Telefax: 06221/454770

- (2) Titel: Die Sequenz der Dihydroorotat-Dehydrogenase aus
Corynebacterium glutamicum und deren
Einsatz zur mikrobiellen Produktion von Pyrimidinen
25 und/oder mit Pyrimidin verwandten Verbindungen

(3) Anzahl der Sequenzen: 2

(4) Art der vom Computer lesbaren Form:

30

- (A) Datenträger: Diskette
(B) Computer: IBM PC kompatibel
(C) Betriebssystem: Windows NT
(D) Software: Microsoft®word 97 SR-1

35

(I) Angaben zur SEQ ID NR. 1:

(1) Sequenzcharakteristika:

- 40 (A) Länge: 966
(B) Art: Nucleinsäure
(C) Strangtyp: Doppelstrang
(D) Topologie: linear

45 (2) Art des Moleküls: DNA

- (3) hypothetisch: nein
(4) Antisense: nein

(5) Herkunft:

(A) Organismus: *Corynebacterium glutamicum*

5 (6) Beschreibung der Sequenz: SEQ ID NR. 1:

ATGGAAAAATCATCGCAGTGCACGATGATTCCCTCTCCCAGGAAGTCTTCGGCGTCACCTTCCC
ACGACCACTAGGCCTCGCCGCAGGTTTCGACAAAAACGCATCAATGGCTGATGCCTGGGGTGCCG
TTGGATTTCGGATACGCCGAACCTGGGCACCGTCACCGCCTCCCCACAGCCAGGAAACCCCAACCCG
10 CGCCTTTTCCGCCTGCCTGCCGACAAAGCTATCTTGAACCGCATGGGATTCAACAACCTGGGTGC
AGCAGAAGTCGCAAAAAACCTGCGCAACCGGAAATCCACCGATGTCATCGGCATCAACATCGGTA
AAACCAAGTGGTTCCCGCTGAACACGCAGTAGATGACTACCGCCGTTCTGCATCTTTGTTAGGT
GATCTTGCTGATTACCTGGTTGTCAACGTTTCCTCCCCCAACACTCCGGGTCTCCGCGATCTGCA
GGCTGTGGAATCTTTGCGACCAATCCTCGCCGAGTGCAGGAATCCACCACCGTCCCAGTCTTGG
15 TGAAATCGCACCAGACCTCTCCGACGAAGACATCGACGCCGTAGCTGACCTGGCAGTTGAGCTC
AAACTCGCCGGAATCGTAGCCACCAATACCACCATTTCCCGCGAAGGCCTCAACACTCCTTCAGG
TGAAGTCGAAGCCATGGGTGCTGGCGGAATCTCCGGTGCTCCAGTAGCAGCCCGATCTTTGGAGG
TACTCAAGCGCCTCTACGCACGGGTAGGCAAAGAGATGGTGTGATCTCTGTCGGTGGCATCAGC
ACCCCTGAGCAAGCCTGGGAACGCATCACCTCCGGCGCAACCCTTCTGCAGGGATACACCCCAT
20 CATCTACGGTGGCCCCGATTGGATCAGAGATATCCACCTTGGTATCGCCAAGCAGCTGAAAGCTC
ACGGTCTGCGCAACATCGCTGACGCTGTGGGCAGCGAATTGGAGTGAAGAATAA

(I) Angaben zur SEQ ID NR. 2:

25 (1) Sequenzcharakteristika:

(A) Länge: 322
(B) Art: Aminosäure
(C) Strangtyp: eine Kette
30 (D) Topologie: linear

(2) Art des Moleküls: Aminosäure
(3) hypothetisch: nein
(4) Antisense: nein
35 (5) Herkunft:

(B) Organismus: *Corynebacterium glutamicum*

(6) Beschreibung der Sequenz: SEQ ID NR. 2:

40

MEKIIAVHDDSLSQEVFGVTFPRPLGLAAGFDKNASMAWGA VGFYAE LGTVTAS PQGNPTP
RLFRLPADKAILNRMGFNNLGAAEVAKNLRNRKSTDVIGINIGKTKVPAEHA VDDYRRSASLLG
DLADYLVVNVSSPNTPLRLDLQAVESLRPILAAVQESTTVPVLVKIAPDLSDEDIDAVADLAVEL
KLAGIVATNTTISRGLNTPSGEVEAMGAGGISGAPVAARSLEVLKRLYARVGKEMVLISVGGIS
45 TPEQAWERITSGATLLQGYTPFIYGGPDWIRDIHLGIAKQLKAHGLRNIA DAVGSELEWKN

Patentansprüche

1. Ein Polypeptid mit Dihydroorotat-Dehydrogenaseaktivität, das
5 aus der folgenden Gruppe ausgewählt wurde:
 - (a) ein Polypeptid mit einer Aminosäuresequenz, wie sie in der SEQ ID NR. 2 beschrieben ist,
 - 10 (b) ein Polypeptid, das im Vergleich zu (a) durch Deletion, Insertion oder Substitution einer oder mehrerer Aminosäuren verändert ist.
2. Ein Polynucleotid, das ein dem Anspruch 1 entsprechendes
15 Polypeptid kodiert.
3. Ein Genkonstrukt, das zumindest aus einer Kopie eines dem Anspruch 2 entsprechenden Polynucleotids zusammen mit zumindest einer regulatorischen Sequenz besteht.
20
4. Ein Wirtsorganismus, der mit einem dem Anspruch 3 entsprechenden Gen transformiert ist.
5. Ein Prozeß zur Produktion von Pyrimidinen und Pyrimidin-
25 derivaten, bei dem ein dem Anspruch 4 entsprechender Wirtsorganismus kultiviert und in der Folge das Pyrimidin oder das Pyrimidinderivat isoliert wird.

30

35

40

45

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

| | | |
|--|---|---|
| Int. Application No PCT/EP 00/05850 | | |
| A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12N15/53 C12N9/02 C12N1/21 C12P17/12 C12P19/38 | | |
| According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC | | |
| B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C12N C12P Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) WPI Data, PAJ, CAB Data, STRAND, BIOSIS, EPO-Internal | | |
| C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| A | EP 0 312 912 A (KYOWA HAKKO KOGYO KK) 26 April 1989 (1989-04-26) the whole document | |
| A | NUDLER A A ET AL: "THE DEREPRESSION OF ENZYMES OF DE-NOVO PYRIMIDINE BIOSYNTHESIS PATHWAY IN BREVIBACTERIUM-AMMONIAGENES PRODUCING UMP AND URACIL" FEMS (FEDERATION OF EUROPEAN MICROBIOLOGICAL SOCIETIES) MICROBIOLOGY, vol. 82, no. 3, 1991, pages 263-266, XP000952766 1991 ISSN: 0378-1097 cited in the application the whole document | |
| -/- | | |
| <input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex. | | |
| * Special categories of cited documents : <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed </div> <div style="width: 45%;"> "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "&" document member of the same patent family </div> </div> | | |
| Date of the actual completion of the international search <div style="text-align: center;">17 October 2000</div> | | Date of mailing of the international search report <div style="text-align: center;">07/11/2000</div> |
| Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016 | | Authorized officer <div style="text-align: center;">Hornig, H</div> |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/EP 00/05850

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|------------|---|-----------------------|
| A | <p>DATABASE SWISSPROT SEQUENCE 'Online! Hinxton, GB; D.R. SMITH AND K. ROBISON: "Dihydroorotate Dehydrogenase; Mycobacterium leprae" XP002150270 Swissprot Accession no. P46727 abstract</p> | |
| A | <p>JENSEN K F ET AL: "STUDIES ON THE STRUCTURE AND EXPRESSION OF ESCHERICHIA-COLI PYR-C PYR-D AND PYR-F USING THE CLONED GENES" EUROPEAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY, vol. 140, no. 2, 1984, pages 343-352, XP000952781 ISSN: 0014-2956</p> | |
| A | <p>GUERRY-KOPECKO P ET AL: "CLONING OF THE URA-1 GENE OF SACCHAROMYCES-CEREVISIAE" JOURNAL OF BACTERIOLOGY, vol. 143, no. 3, 1980, pages 1530-1533, XP000952763 ISSN: 0021-9193 the whole document</p> | |
| A | <p>GHIM SA-YOUL ET AL: "Molecular characterization of pyrimidine biosynthesis genes from the thermophile Bacillus caldolyticus." MICROBIOLOGY (READING), vol. 140, no. 3, 1994, pages 479-491, XP000946941 the whole document</p> | |
| A | <p>EP 0 471 466 A (LILLY CO ELI) 19 February 1992 (1992-02-19) the whole document</p> | |
| A | <p>DATABASE BIOSIS 'Online! BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; October 1998 (1998-10) CHUN JAE-YEON ET AL: "Molecular cloning and analysis of the argC gene from Corynebacterium glutamicum." Database accession no. PREV199900017893 XP002150271 abstract & BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY INTERNATIONAL, vol. 46, no. 3, October 1998 (1998-10), pages 437-447, ISSN: 1039-9712</p> | |

-/-

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 00/05850

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|------------|--|-----------------------|
| A | <p>CORDES C ET AL: "CLONING ORGANIZATION AND FUNCTIONAL ANALYSIS OF ILVA ILVB AND ILVC GENES FROM CORYNEBACTERIUM-GLUTAMICUM" GENE (AMSTERDAM), vol. 112, no. 1, 1992, pages 113-116, XP002150268 ISSN: 0378-1119 the whole document</p> | |
| A | <p>CREMER J ET AL: "CLONING THE DAP-A DAP-B CLUSTER OF THE LYSINE-SECRETING BACTERIUM CORYNEBACTERIUM-GLUTAMICUM" MOLECULAR & GENERAL GENETICS, vol. 220, no. 3, 1990, pages 478-480, XP002150269 ISSN: 0026-8925 the whole document</p> | |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 00/05850

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|---|---------------------|----------------------------|---------------------|
| EP 0312912 A | 26-04-1989 | JP 1104189 A | 21-04-1989 |
| | | JP 1978911 C | 17-10-1995 |
| | | JP 7010235 B | 08-02-1995 |
| | | DE 3883911 D | 14-10-1993 |
| | | DE 3883911 T | 27-01-1994 |
| | | KR 9105630 B | 01-08-1991 |
| | | US 5013656 A | 07-05-1991 |
| EP 0471466 A | 19-02-1992 | CA 2048359 A | 04-02-1992 |
| | | JP 4229180 A | 18-08-1992 |
| | | US 5976848 A | 02-11-1999 |

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Int: Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 00/05850

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 C12N15/53 C12N9/02 C12N1/21 C12P17/12 C12P19/38

Nach der internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C12N C12P

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

WPI Data, PAJ, CAB Data, STRAND, BIOSIS, EPO-Internal

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

| Kategorie* | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile | Betr. Anspruch Nr. |
|------------|---|--------------------|
| A | EP 0 312 912 A (KYOWA HAKKO KOGYO KK) 26. April 1989 (1989-04-26) das ganze Dokument | |
| A | NUDLER A A ET AL: "THE DEREPRESSION OF ENZYMES OF DE-NOVO PYRIMIDINE BIOSYNTHESIS PATHWAY IN BREVIBACTERIUM-AMMONIAGENES PRODUCING UMP AND URACIL" FEMS (FEDERATION OF EUROPEAN MICROBIOLOGICAL SOCIETIES) MICROBIOLOGY, Bd. 82, Nr. 3, 1991, Seiten 263-266, XP000952766 1991 ISSN: 0378-1097 in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument | |

-/-



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfindertischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfindertischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

17. Oktober 2000

Abschließdatum des internationalen Recherchenberichts

07/11/2000

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Hornig, H

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

| Kategorie* | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile | Betr. Anspruch Nr. |
|------------|--|--------------------|
| A | <p>DATABASE SWISSPROT SEQUENCE 'Online! Hinxton, GB; D.R. SMITH AND K. ROBISON: "Dihydroorotate Dehydrogenase; Mycobacterium leprae" XP002150270 Swissprot Accession no. P46727 Zusammenfassung</p> | |
| A | <p>JENSEN K F ET AL: "STUDIES ON THE STRUCTURE AND EXPRESSION OF ESCHERICHIA-COLI PYR-C PYR-D AND PYR-F USING THE CLONED GENES" EUROPEAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY, Bd. 140, Nr. 2, 1984, Seiten 343-352, XP000952781 ISSN: 0014-2956</p> | |
| A | <p>GUERRY-KOPECKO P ET AL: "CLONING OF THE URA-1 GENE OF SACCHAROMYCES-CEREVISIAE" JOURNAL OF BACTERIOLOGY, Bd. 143, Nr. 3, 1980, Seiten 1530-1533, XP000952763 ISSN: 0021-9193 das ganze Dokument</p> | |
| A | <p>GHIM SA-YOUL ET AL: "Molecular characterization of pyrimidine biosynthesis genes from the thermophile Bacillus caldolyticus." MICROBIOLOGY (READING), Bd. 140, Nr. 3, 1994, Seiten 479-491, XP000946941 das ganze Dokument</p> | |
| A | <p>EP 0 471 466 A (LILLY CO ELI) 19. Februar 1992 (1992-02-19) das ganze Dokument</p> | |
| A | <p>DATABASE BIOSIS 'Online! BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; Oktober 1998 (1998-10) CHUN JAE-YEON ET AL: "Molecular cloning and analysis of the argC gene from Corynebacterium glutamicum." Database accession no. PREV199900017893 XP002150271 Zusammenfassung & BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY INTERNATIONAL, Bd. 46, Nr. 3, Oktober 1998 (1998-10), Seiten 437-447, ISSN: 1039-9712</p> | |

-/-

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Int. Internationale Aktenzeichen

PCT/EP 00/05850

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

| Kategorie* | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile | Betr. Anspruch Nr. |
|------------|--|--------------------|
| A | <p>CORDES C ET AL: "CLONING ORGANIZATION AND FUNCTIONAL ANALYSIS OF ILVA ILVB AND ILVC GENES FROM CORYNEBACTERIUM-GLUTAMICUM" GENE (AMSTERDAM), Bd. 112, Nr. 1, 1992, Seiten 113-116, XP002150268 ISSN: 0378-1119 das ganze Dokument</p> | |
| A | <p>CREMER J ET AL: "CLONING THE DAP-A DAP-B CLUSTER OF THE LYSINE-SECRETING BACTERIUM CORYNEBACTERIUM-GLUTAMICUM" MOLECULAR & GENERAL GENETICS, Bd. 220, Nr. 3, 1990, Seiten 478-480, XP002150269 ISSN: 0026-8925 das ganze Dokument</p> | |